



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 7/02, B01D 15/08, B01J 8/18	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/50573 (43) Date de publication internationale: 31 août 2000 (31.08.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00430 (22) Date de dépôt international: 21 février 2000 (21.02.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/02167 22 février 1999 (22.02.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KOEHL, Michel [FR/FR]; 5, quai Saint-Thomas, F-67000 Strasbourg (FR). GAILLAC, David [FR/FR]; 11, Résidence Plein-Sud, 83, avenue de Versailles, F-94320 Thiais (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avec revendications modifiées.</i>
(54) Title: METHOD FOR OBTAINING A PURIFIED VIRAL PREPARATION (54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION D'UNE PREPARATION VIRALE PURIFIEE (57) Abstract <p>The invention concerns a method for purifying a crude viral preparation containing viral, in particular adenoviral, particles of interest. The invention is characterised in that it comprises a step of adsorption on a fluidised bed. The invention also concerns a protocol for producing viral particles for use in gene therapy comprising such a purifying process.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un procédé de purification d'une préparation virale brute renfermant des particules virales d'intérêt, notamment adénovirales, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé. Elle a également pour objet un protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant un tel procédé de purification.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE D'OBTENTION D'UNE PREPARATION VIRALE PURIFIEE

La présente invention a pour objet un nouveau procédé de purification d'une préparation virale. L'invention présente un intérêt tout particulier dans la perspective d'applications dans le domaine de la thérapie génique, appliquée notamment à l'homme.

La thérapie génique se définit comme le transfert d'information génétique présentant un intérêt thérapeutique ou vaccinal dans une cellule ou un organisme hôte en vue d'obtenir dans cette cellule ou cet organisme un effet thérapeutique ou vaccinal. Le premier protocole appliqué à l'homme a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient présentant une immunodéficience liée à une mutation du gène codant pour l'Adénine Désaminase (ADA). Dans ce cadre particulier, il s'agissait de remplacer le gène défectueux, dont le dysfonctionnement était à l'origine de la maladie génétique, par un gène fonctionnel. Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le développement de cette technologie dont l'application a depuis été étendue au traitement d'autres maladies aussi bien génétiques qu'acquises (cancers, maladies infectieuses telles que par exemple le SIDA).

La mise en oeuvre des protocoles de thérapie génique repose principalement sur l'utilisation de vecteurs qui permettent le transfert et, éventuellement, l'expression de l'information génétique d'intérêt ou gène dans une cellule ou un organisme hôte. De nombreux vecteurs d'origine virale et non-virale ont été développés au cours des dernières années et ont fait l'objet de nombreuses publications accessibles à l'homme du métier (par exemple voir Robbins et al., 1998, Tibtech, 16, 35-40 et Rolland, 1998, Therapeutic Drug Carrier Systems, 15, 143-198).

L'intérêt des virus utilisés à titre de vecteurs de thérapie génique a

déjà été évoqué dans l'art antérieur. Parmi les virus les plus couramment utilisés, les adénovirus constituent des vecteurs de choix car ils peuvent être utilisés dans le cas de nombreux types cellulaires, qu'il s'agisse de cellules en division ou quiescentes, ils sont non intégratifs et peu pathogènes. Ainsi
5 que le décrivent les demandes de brevets n° WO 94/28152 ou WO 94/12649, ils trouvent de nombreuses applications dans le domaine de la thérapie génique. Toutefois, les propriétés de nombreux autres virus ont également été exploitées pour la mise au point de vecteurs viraux de thérapie génique. A titre d'exemple, on peut citer les vecteurs poxviraux, et plus particulièrement
10 les vecteurs dérivés du virus de la vaccine ou du Virus Modifié d'Ankara (MVA ; EP 324350), les vecteurs rétroviraux (Naldini et al., 1996, Science, 272, 263-267), etc...

Les virus, et notamment les adénovirus, actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont des virus dont le génome a été modifié
15 (par délétion, mutation,...) de manière à affecter leur propriété répllicative dans le but d'éviter leur propagation dans l'environnement ou l'organisme hôte, à réduire leur propriété immunogène et à permettre l'introduction de séquences nucléiques hétérologues d'intérêt. Plus particulièrement, comme le décrit notamment la demande de brevet WO 94/28152, le génome de ces virus peut
20 être spécifiquement délété de régions essentielles à l'obtention de particules virales infectieuses. De même, les demandes de brevet EP83286, EP110385, US5185146, WO9702355 décrivent l'identification de formes virales naturellement atténuées qui peuvent être exploitées pour l'élaboration de vecteurs viraux. Un virus dans le génome duquel est introduit au moins un
25 gène d'intérêt est appelé «virus recombiné» et par extension «vecteur recombiné» ; plus particulièrement de tels virus recombinés comprennent également les éléments appropriés pour l'expression de ces gènes dans les cellules ou organismes hôtes.

Les virus présentent la caractéristique de se multiplier essentiellement de manière intra-cellulaire. Par ailleurs, dans le cadre de la mise en oeuvre de protocoles de thérapie génique, il est nécessaire de disposer de particules virales, notamment infectieuses, qui renferment un vecteur d'intérêt, notamment recombiné, associé à des polypeptides spécifiques et qui sont utilisables comme produit pour la thérapie génique. Des procédés pour la production de particules virales utilisables dans le cadre de protocoles de thérapie génique sont connus qui comprennent les étapes suivantes:

- 10 (i) obtention d'une préparation virale brute ,
- (ii) purification de ladite préparation virale brute.

La préparation virale brute est obtenue selon les étapes suivantes :

- (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné ;
- 15 (b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la replication virale et la production de particules virales ;
- (c) collecte des cellules ;
- (d) étape facultative de traitement des cellules, notamment selon un protocole de lyse cellulaire, de façon à libérer les particules virales intracellulaires produites, en particulier lorsque les particules virales produites ne sont pas libérées dans le milieu pendant l'étape de culture ;
- 20 (e) et éventuellement un traitement supplémentaire du mélange obtenu à l'étape (c) ou (d) par une DNase destiné à limiter la quantité d'ADN cellulaire et à réduire la viscosité du mélange.
- 25

Outre les particules virales produites dans les cellules, la préparation virale brute comprend aussi toute sorte de constituants, débris cellulaires,

toxines, etc...qu'il est nécessaire d'éliminer par la mise en oeuvre d'une ou plusieurs étapes de purification permettant d'obtenir une préparation renfermant des particules virales purifiées utilisables en thérapie génique.

Selon les procédés connus de l'art antérieur, la purification de la
5 préparation virale brute est réalisée soit par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium (Huyghe, B et al., 1995, Human Gene Therapy, 6, 1403-1416), soit par adsorption en lit paqué (Huyghe, B et al., 1995, Human Gene Therapy, 6, 1403-1416).

L'ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium présente de
10 nombreux inconvénients. En effet, le chlorure de césium est un composé toxique incompatible avec un usage thérapeutique chez l'homme qu'il convient d'éliminer par une étape supplémentaire de purification. Par ailleurs, cette technique d'ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium est surtout adaptée au traitement de volumes réduits de préparation virale brute.
15 En effet, les dispositifs d'ultracentrifugation permettent seulement le traitement de l'ordre de 600 ml de préparation virale brute. Si de tels volumes sont bien adaptés à des productions destinées aux travaux de recherche, ils ne permettent pas de répondre de manière satisfaisante aux contraintes d'une production industrielle. En outre, la technique d'ultracentrifugation n'est pas
20 automatisable. Enfin, le temps nécessaire à la mise en oeuvre de cette technique de purification par ultracentrifugation, environ 40 heures, est également un élément très limitant dans des perspectives de productions industrielles. Chacun de ces inconvénients indique que cette technique de purification d'une préparation virale brute est incompatible avec les exigences
25 de rendement et de coût requises par les industriels.

La méthode de purification par adsorption en lit paqué repose sur l'utilisation de particules d'adsorbant sédimentées ou compactées les unes aux autres, disposées dans une colonne de chromatographie. Selon ce

procédé de purification, la préparation virale brute à purifier est déposée sur la colonne et les particules virales sont purifiées par éluions différentielles successives. Toutefois, étant donné la composition complexe de la préparation virale brute, comprenant notamment des débris cellulaires, la colonne de chromatographie se colmate fréquemment rendant la purification laborieuse et inefficace. Afin d'éviter ce colmatage, il est possible de procéder, avant le dépôt de la préparation sur la colonne de chromatographie, à une étape de clarification de ladite préparation virale brute afin d'éliminer les débris cellulaires. Il est également proposé de réaliser des étapes de concentration, d'ajustement du pH ou de la conductivité de la préparation virale brute avant son passage sur la colonne. Ces étapes supplémentaires et indispensables entraînent une baisse du rendement global du procédé de purification qui ne permet pas d'obtenir des rendements de production compatibles avec une exploitation industrielle satisfaisante.

Dans ce contexte, il serait avantageux de pouvoir disposer d'une nouvelle méthode pour la préparation, à partir de cultures cellulaires, de particules virales suffisamment purifiées pour permettre leur utilisation en thérapie génique. Plus particulièrement, les procédés décrits jusque-là ne sont pas satisfaisants en ce qu'ils comprennent des étapes limitantes au niveau du volume de préparation virale brute à purifier (ultracentrifugation) et / ou par leur nombre trop important qui se traduit par une baisse du rendement global de l'ordre de 5 à 20% ne permettant pas de satisfaire une exploitation à l'échelle industrielle.

On a maintenant mis au point un nouveau procédé de purification d'une préparation virale brute parfaitement adapté à la production industrielle de particules virales destinées aux applications de thérapie génique.

La présente invention concerne en premier lieu un procédé de purification d'une préparation virale brute, renfermant des particules virales

d'intérêt, notamment adénovirales, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.

Le principe de l'adsorption en lit fluidisé est brièvement exposé ci-après. Des explications plus détaillées sont disponibles dans « Expanded Bed Adsorption , Principles and Methods » - Pharmacia Biotech - Edition AA ainsi
5 que dans le brevet US 5,522,993 dont les contenus font partie de la présente description.

A l'inverse de l'adsorption en lit paqué pour laquelle des particules solides d'adsorbant sont sédimentées ou compactées les unes contre les
10 autres, l'adsorption en lit fluidisé repose sur le principe selon lequel des particules solides d'adsorbant comprises dans ledit lit fluidisé sont maintenues en suspension dans un fluide (gazeux ou liquide) générant ainsi entre elles des espaces libres. Cette suspension des particules d'adsorbant est obtenue par l'action d'une ou plusieurs forces (mécanique,
15 électromagnétique, magnétique, gravitationnelle, électrique...). La suspension des particules d'adsorbant dans un fluide liquide ou gazeux peut par exemple être obtenue par la combinaison d'un courant dudit fluide dirigé de manière opposée au champ gravitationnel auquel sont naturellement soumises les particules d'adsorbant. La direction et l'intensité des deux forces sont
20 aisément choisies par l'homme de l'art afin de maintenir les particules d'adsorbant en suspension. De même, il est possible d'utiliser des particules d'adsorbant qui présentent une composition particulière qui les rend sensibles à une force magnétique ou/et électrique et permet ainsi d'obtenir une suspension de particules d'adsorbant comme précédemment décrite. Enfin,
25 il est également possible de disposer de particules d'adsorbant qui présentent elles-mêmes une charge magnétique ou électrique suffisante pour permettre leur mise en suspension dans des conditions appropriées. L'homme du métier dispose des connaissances nécessaires à la réalisation de ces variantes de

l'invention.

L'expansion, ou mise en suspension, des particules d'adsorbant génère l'apparition d'espaces entre lesdites particules qui permettent le passage des cellules, débris cellulaires ou autres particules indésirables que
5 l'on souhaite éliminer de la préparation virale brute.

Selon la présente invention, les particules d'adsorbant utilisées dans l'étape d'adsorption en lit fluidisé sont notamment sélectionnées parmi des particules constituées :

- de matériaux composites, organiques et/ou inorganiques, tels que
10 par exemple la silice, la dextrane-silice ou la cellulose-titane-dioxyde (Gilcrist et al., 1994, Separations for Biotechnology, 3 , pp. 184-190);
- de polymères tels que par exemple l'agarose, le polyacrylamide, le polystyrène ou leurs dérivés (par exemple le poly(N-isopropyl acrylamide), voir CA2147115).

15 Selon un mode particulier de réalisation, les particules d'adsorbant comprennent en outre un noyau central. Un tel noyau central consiste notamment en un noyau de quartz ou de métal inerte (tel que du zirconium) (Hansson et al., 1994, Biotechnology, 12, 285-288 ; Hjorth et al., 1995, Bioseparation, 5, 217-223) ou en un noyau dont la composition permet
20 auxdites particules d'adsorbant l'incorporant d'être maintenues en suspension dans le fluide par l'application d'un champ magnétique, électrique ou électromagnétique (voir par exemple "Continuous cell suspension processing using magnetically stabilized fluidized beds" Biotechnology and Bioengineering, vol. 37 pp110-120 (1991) by B.E. Terranova and M.A. Burns).

25 Selon un cas préféré de l'invention, les particules d'adsorbant portent, directement ou indirectement, au moins un ligand capable de se lier de manière spécifique et réversible à un anti-ligand. Conformément à la présente invention, undit anti-ligand consiste en tout ou partie d'une particule virale

d'intérêt que l'on souhaite purifier à partir d'une préparation virale brute.

Par "ligand", on entend désigner :

- tout ou partie d'un polypeptide, capable de se lier de manière spécifique et réversible à tout ou partie d'une protéine de ladite particule virale d'intérêt, notamment une protéine de la capside ou de l'enveloppe, une protéine située à la surface de la particule adénovirale telle que l'hexon, les pentons (Hong et al, 1995, EMBO J., 14, 4714-4727), ou la fibre (Henry et al, 1994, J.Virol., 68, 5239-5246) etc... Il peut s'agir notamment de tout ou partie d'un anticorps, d'un récepteur membranaire spécifique, d'un peptide recombinant ou encore de la protéine A.
- tout ou partie d'une molécule autre qu'un polypeptide capable de lier de manière réversible ladite particule virale d'intérêt ou l'un de ses constituants (l'une des protéines citée ci-dessus). A titre d'exemples, on peut citer les héparines et les ligands d'affinité utilisés en IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography).
- un groupement chargé positivement, notamment un groupement basique, portant par exemple une amine substituée, notamment par des groupes alkyles ; de manière préférée, on choisira un groupement chargé basique sélectionné parmi les groupements diméthylaminoéthyl (DMAE), diéthylaminoéthyl (DEAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), le groupement $-R-CH(OH)-CH_2-N^+(CH_3)_3$ (également appelé groupement Q ; voir les résines Streamline® - Pharmacia), le groupement guanidinium ou encore les groupements imine tels que la polyéthylèneimine (PEI) ;
- un groupement chargé négativement, tel que par exemple un groupement sulfate de formule $R-SO_4^-$ avec par exemple $R =$ groupes alkyles (par exemple méthyl sulfate) ou un groupement carboxylate de formule $R-COO^-$ avec par exemple $R =$ groupes alkyles (par exemple méthyl carboxylate) ou encore un groupement phosphate de formule $R-PO_4^-$ avec par

exemple R = groupes alkyles.

De tels ligands chargés positivement ou négativement sont capables de se lier de manière spécifique à des anti-ligands de charge opposée.

Dans le cadre de la présente invention, les particules d'adsorbant
5 préférées sont constituées d'une matrice d'agarose et comprennent un noyau central de quartz et des chaînes de dextrane couplées de manière covalente à la matrice d'agarose sur lesquelles sont liées les groupements chargés positivement. D'une manière tout à fait préférée, les particules d'adsorbant sont les résines Streamline® de type XL commercialisées par Pharmacia et,
10 tout particulièrement, la résine Streamline® Q XL constituée d'une matrice d'agarose (6 %) et comprenant un noyau central de quartz et des chaînes de dextrane couplées de manière covalente à la matrice d'agarose sur lesquelles sont liées des groupements Q.

L'invention concerne également le cas pour lequel ledit ligand est
15 indirectement fixé sur la particule d'adsorbant. Dans ce cas, ledit ligand est fixé par l'intermédiaire d'un bras chimique qui n'interfère pas dans la réactivité dudit ligand à l'égard de l'anti-ligand. De tels bras ainsi que leur utilisation sont largement décrits dans la littérature relative aux synthèses chimiques.

Il est également possible de choisir le pH auquel le procédé de
20 l'invention sera réalisé de manière à optimiser la liaison spécifique ligand/anti-ligand, notamment dans le cas où l'on utilise des particules d'adsorbant portant un ligand chargé. Ainsi, dans le cas où l'on choisira d'utiliser des particules d'adsorbant porteuses de groupements basiques, notamment pour la purification de particules adénovirales dont les protéines
25 de surface ont en majorité des points isoélectriques (pI) compris entre 5.3 et 6.0, le pH sera compris entre environ 6 et environ 10, avantageusement entre environ 7.5 et environ 9.5 et, de façon préférée sera d'environ 8.5, de manière à ce que l'essentiel des protéines virales soit chargé négativement et

interagisse avec les groupements basiques des particules d'adsorbant. Inversement, lorsque le procédé selon l'invention utilise des particules d'adsorbant portant des groupements chargés négativement, le pH choisi sera compris entre environ 3.0 et environ 5.0. Par ailleurs, il est également possible de travailler à des pH inférieurs au pI des protéines virales, notamment lorsque l'on utilise des particules d'adsorbant portant un ligand chargé négativement. Dans ce cas particulier, il est nécessaire d'utiliser un tampon de conductivité élevée afin de stabiliser les particules virales. L'homme du métier est en mesure d'ajuster le pH par l'utilisation de solutions tamponnées ou par l'ajout de bases ou d'acides pour respectivement augmenter ou réduire le pH selon les besoins.

Pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, il est nécessaire que le ligand soit capable de se lier de manière réversible à l'anti-ligand d'intérêt. L'homme du métier est en mesure d'établir les conditions optimales en fonction du ligand, de l'anti-ligand et des particules d'adsorbant utilisées. A titre indicatif, un tampon équilibré à une concentration finale en NaCl de 400 mM est particulièrement adapté à la mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention utilisant la résine Streamline® Q XL pour la purification d'adénovirus recombinés. La dissociation ligand/anti-ligand peut être réalisée par tout moyen approprié et notamment en modifiant la salinité ou le pH du milieu réactionnel. De manière préférée, la dissociation est réalisée en augmentant la salinité.

En outre, selon l'invention, il est possible de suivre le procédé de purification, notamment en continu, sur les échantillons récoltés et traités selon le procédé de l'invention par tout moyen connu de l'homme de l'art. Il est notamment possible d'effectuer des mesures spectrophotométriques de l'absorbance à 260 nm et 280 nm et de calculer le ratio DO260/DO280 dans chaque échantillon sachant que toute préparation virale purifiée possède un

ratio DO 260 / DO 280 caractéristique. A titre indicatif, le ratio DO260/DO280 d'un préparation adénovirale purifiée est d'environ 1,25 (1,22 à 1,28). Il est également possible de suivre le procédé de purification par la mise en oeuvre de techniques de détection usuelles telles que par exemple des techniques
5 d'électrophorèse, de PCR, d'immunofluorescence et de détermination du titre viral.

La température à laquelle est mis en oeuvre le procédé selon l'invention est préférentiellement comprise entre -5 et +50°C. Cependant, afin de préserver les propriétés infectieuses des particules virales que l'on
10 souhaite purifier, on préférera une température comprise entre environ +4°C et +37°C et, plus particulièrement, entre environ +15°C et +25°C.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention est réalisé dans des conditions de conductivité comprises entre environ 25 et environ 70 mS/cm, avantageusement entre environ 30 et environ 40 mS/cm
15 et, de préférence, entre environ 30 et environ 35 mS/cm. Cependant, il est à la portée de l'homme de l'art de faire varier la conductivité selon la nature des contaminants et la composition du milieu de culture des particules virales. Avantageusement, les particules virales d'intérêt et les particules d'adsorbant sont équilibrées aux mêmes conditions de conductivité.

20 Lorsque le lit fluidisé est formé, c'est à dire que les particules d'adsorbant sont en suspension, il est possible que celles-ci soient animées d'un mouvement circulaire permanent connu sous le nom de « rouleaux de recirculation ». Ce phénomène diminue la capacité d'adsorption des particules et doit par conséquent être limité au maximum. Une solution possible
25 consiste à utiliser des particules d'adsorbant de tailles hétérogènes. En effet, la distribution hétérogène des tailles permet aux particules d'adsorbant de plus petit volume de se localiser dans la partie supérieure du dispositif, par exemple une colonne, qui les renferme. Au contraire, les particules les plus

grosses sont localisées dans la partie inférieure dudit dispositif ce qui permet de réduire de manière importante la mobilité des particules.

Par conséquent, de manière préférentielle, les particules d'adsorbant selon l'invention seront choisies de façon à se qu'elles présentent des tailles
5 hétérogènes.

Une autre solution permettant d'éviter la formation de rouleaux de recirculation consiste à compartimenter le dispositif afin de limiter les possibilités de mouvement des particules d'adsorbant (A. Buijs and J.A. Wesselingh, 1980, Journal of Chromatography, vol.201 pp 319-327).

10 Comme évoqué ci-dessus, pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, les particules d'adsorbant sont maintenues en suspension dans un dispositif. De manière avantageuse, ledit dispositif est de forme cylindrique et de manière préférée il s'agit d'une colonne de chromatographie. Dans un mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, on choisira une
15 colonne de chromatographie telle que décrite dans le brevet US 5, 522, 993. Cette colonne présente à chacune de ses extrémités au moins une entrée ou une sortie par lesquelles circulent les solutions d'effluent et d'éluant entrant et sortant de la colonne. Selon ce cas particulier, les particules d'adsorbant sont dans un premier temps soumises à une phase d'expansion, notamment
20 par application dans la colonne de chromatographie d'un courant de tampon ascendant obtenu en introduisant le tampon par l'entrée localisée à l'extrémité inférieure de la colonne et en l'évacuant par la sortie située à l'extrémité supérieure. Cette phase d'expansion est maintenue jusqu'à l'obtention d'un « lit fluidisé », c'est à dire d'un équilibre entre la force de la gravité terrestre
25 qui attire les particules d'adsorbant vers l'extrémité inférieure de la colonne, et les forces d'entraînement du courant ascendant du tampon qui sont dirigées vers l'extrémité supérieure de la colonne.

Conformément à la présente invention, la préparation virale brute est

soumise à un procédé de purification comprenant une étape au moins d'adsorption en lit fluidisé. Plus particulièrement lorsque le dispositif est une colonne, après obtention du «lit fluidisé», la préparation virale brute à purifier est déposée sur la colonne. Dans le cas préféré de l'invention pour lequel

5 ladite colonne est telle que décrite dans le brevet US 5, 522, 993, la préparation virale brute est introduite dans la partie inférieure de cette colonne. Ensuite, la préparation virale brute est lavée par passage de tampon. Dans le cas préféré, le passage de tampon est effectué selon un courant ascendant. Après la phase de lavage, le flux de tampon est stoppé

10 afin de permettre aux particules d'adsorbant de sédimenter. Selon un cas préféré, cette phase de sédimentation est assistée par un flux de tampon descendant. Une étape d'élution est alors conduite par application d'un flux de tampon, notamment descendant, dans des conditions de concentration, de pH et/ou de conductivité que l'homme du métier est en mesure d'adapter

15 afin de permettre le relargage des particules virales adsorbées sur les particules adsorbantes. De même, il est à la portée de l'homme de l'art d'adapter les conditions de chromatographie en fonction de différents paramètres, notamment du volume de la colonne, des particules d'adsorbant choisies, de la hauteur des particules d'adsorbant dans ladite colonne

20 (généralement de 10 à 50 cm, avantageusement de 10 à 40 cm et, de préférence aux environs de 30 cm), du débit (de 50 à 600 cm/h, avantageusement de 100 à 400 cm/h et, de préférence aux environs de 300 cm/h particulièrement pour une colonne de résine Streamline® Q XL d'une hauteur d'environ 30 cm), de la concentration virale, de la charge et/ou de la

25 nature des contaminants. L'élution de la préparation virale peut par exemple être réalisée en modifiant la salinité ou le pH de l'éluant.

Le procédé selon l'invention peut en outre comprendre des étapes supplémentaires précédant ou suivant la chromatographie en lit fluidisé.

Selon un mode de réalisation optionnel, les fractions virales éluées obtenues après l'étape de chromatographie en lit fluidisé peuvent être rassemblées et éventuellement concentrées selon les techniques de l'art. On peut citer notamment l'ultrafiltration tangentielle et la diafiltration. Les cassettes BioMax
5 PES (Millipore référence PXB300C50) et PLCKMK (Millipore référence PXC300C50) conviennent tout particulièrement. Cette étape de concentration est tout particulièrement indiquée lorsqu'on envisage de parfaire la pureté de la préparation de particules virales par une étape supplémentaire de chromatographie autre que le lit fluidisé. Cette étape de concentration permet
10 de placer les particules virales dans un milieu adapté à la mise en œuvre de cette deuxième chromatographie.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de purification de la préparation virale brute selon l'invention peut en outre comprendre une étape de chromatographie en lit paqué, et de manière préférée, une étape de
15 chromatographie en gel filtration. Les deux étapes (étape d'adsorption en lit fluidisé et chromatographie en lit paqué) peuvent être réalisées dans un ordre quelconque, toutefois de manière préférée, on procédera en premier lieu à l'étape d'adsorption en lit fluidisé et en second lieu à la chromatographie en lit paqué, notamment à une chromatographie de gel filtration.

20 Selon l'étape de chromatographie de gel filtration, l'échantillon est traité sur un support solide comprenant des billes de diamètre compris entre 3 et 160 μm , avantageusement entre 5 et 105 μm et de préférence entre 10 et 80 μm . De préférence, ce support a une porosité proche de la taille du virus afin que celui-ci ne pénètre pas dans les billes. Au contraire, les molécules
25 de taille inférieure pénètrent dans les billes et leur migration est retardée. Différents types de supports peuvent être utilisés tels que les matrices à base d'agarose (Sépharose), de dextrane (gel Séphadex), d'acrylamide (gels Séphacryl et Trisacryl), la silice (gels TSK et SW), de copolymères éthylène

glycol méthacrylate (gels Biosec, Toyopearl HW, TSK et PW) et de mélanges, notamment d'agarose et de dextran (gel Superdex). Les supports mentionnés sont de préférence utilisés sans groupement de fonctionnalisation. Les supports de chromatographie de gel filtration particulièrement appropriés à la mise en œuvre du procédé de préparation selon l'invention sont les suivants :

- matrices allyl dextran-méthylène bis acrylamide (Séphacryl S300 HR de diamètre de bille compris entre 25 et 75 μm , Séphacryl S400 HR de diamètre de bille compris entre 25 et 75 μm , Séphacryl S500 HR de diamètre de bille compris entre 25 et 75 μm et Séphacryl S1000 SF de diamètre de bille compris entre 40 et 105 μm ; Pharmacia),
- matrices d'éthylène glycol-méthacrylate (Toyopearl HW 55, Toyopearl HW 65 et Toyopearl HW 75 de diamètre de billes variant de 20 à 60 μm ; Tosohaas),
- matrices de N acryl amine hydroxyl propanédiol (Trisacryl d'un diamètre de billes compris entre 80 et 160 μm ; Biosépra), ou
- matrice d'agarose (Macro-Prep SE de diamètre de bille compris entre 20 et 80 μm ; Biorad).

A titre indicatif, on notera qu'un support de type Toyopearl HW65F, S (porosité 1000 Å) ou Séphacryl S400HR est préféré. Une telle colonne est équilibrée dans un tampon présentant des conditions salines et un pH limitant les interactions hydrophobes entre le support et les particules virales. Avantageusement, on utilisera un tampon Tris-HCl 25mM, MgCl_2 2mM, saccharose 2% à pH 8,5 ou un tampon Tris-HCl 10mM, aspartate de sodium 10mM, Tween 80 54 mg/l et saccharose 2% à pH 8,5. Les particules virales d'intérêt sont éluées sans être retenues et sortent de la colonne avant les contaminants de poids moléculaire ou de taille inférieurs. Selon un mode de réalisation optionnel, les fractions virales obtenues après l'étape de

purification peuvent être rassemblées et éventuellement concentrées selon les techniques habituelles. On peut citer l'ultrafiltration tangentielle et la diafiltration. Les cassettes BioMax PES (Millipore référence PXB300C50) et PLCMK (Millipore référence PXC300C52) conviennent tout particulièrement.

5 L'invention concerne également un protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant les étapes (i) et (ii) suivantes :

(i) obtention d'une préparation virale brute comprenant les étapes :

10 (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné;

(b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la réplication virale et la production de particules virales;

15 (c) collecte des cellules et/ou du surnageant,

(ii) purification de ladite préparation virale brute selon un procédé caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé telle que décrite précédemment.

20 Selon un cas particulier préféré, après l'étape (c) de collecte des cellules, on procède à une étape de cassage ou de lyse des cellules, généralement après resuspension de la biomasse cellulaire collectée, afin de permettre la libération des particules virales produites de manière intracellulaire. Tous les moyens classiques peuvent être mis en œuvre, notamment les moyens chimiques et / ou mécaniques. On peut procéder par
25 exemple à des cycles de congélation-décongélation qui fragilisent les membranes cellulaires, à une lyse enzymatique (emploi d'enzymes dégradant les membranes cellulaires) ou chimique (emploi de détergent, choc de pH...). Les moyens mécaniques peuvent résulter d'ultrason (sonication), d'attrition

(billes de verre DynoMill, BeadMill), de forces de pression et de cisaillement (homogénéiseur haute pression French Press), de microfluides (Microfluidics, Newton, MA) ou encore de l'action mécanique de deux cylindres générant des forces de cisaillement hydrauliques et mécaniques (homogénéiseur
5 Silverson).

Toutefois, bien qu'elle ne soit pas exclue, cette étape de cassage/lyse des cellules n'est pas obligatoire dans le cas particulier où les particules virales sont libérées dans le milieu de culture. Dans ce cas, l'étape (ii) peut être directement appliquée à l'échantillon renfermant à la fois les cellules et
10 le milieu, ou exclusivement sur le surnageant de la culture qui renferme les particules virales à purifier.

Le protocole selon l'invention peut en outre comprendre une étape de clarification ayant pour but d'éliminer les insolubles (débris cellulaire, floculats de macromolécules ...etc) éventuellement produits lors de l'étape de cassage
15 ou de lyse des cellules. Elle peut être réalisée par toute technique conventionnelle de filtration (filtration en profondeur, microfiltration tangentielle...) ou centrifugation (en continue...). De nombreux filtres peuvent être utilisés à la condition qu'ils aient une porosité permettant de laisser passer les particules virales d'intérêt et de retenir les insolubles. On indique
20 que les particules adénovirales ont une taille d'environ 0,07 à 0,1 μm qui nécessitent l'utilisation de filtres de porosité supérieure. Par ailleurs, les filtres peuvent être en matière synthétique (nylon), organique (cellulose) ou non organique (zirconium). Selon un mode de réalisation avantageux, on procède à des filtrations successives sur des filtres de porosité décroissante, par
25 exemple en premier lieu sur un filtre de porosité 8 μm (Sartorius 5591301P5-00) puis sur un filtre de porosité 5 μm (Sartorius 5591342P5-00) puis sur un filtre de porosité 3-0,8 μm (Sartorius, Sartoclean CA capsule 5621304E9-00-A) puis, éventuellement, sur un filtre de porosité comprise entre 0,8 et 0,65

µm (Sartorius, Sartoclean CA capsule 5621305G9-00-A). Selon une autre variante, la filtration peut être réalisée par microfiltration tangentielle sur membranes planes ou fibres creuses de porosité supérieure à la taille de l'adénovirus. A cet égard, les membranes Durapore (Millipore) et Omega
5 (Pall) peuvent être employées.

En outre, le protocole pour la production de particules virales utilisables dans le cadre de protocoles de thérapie génique selon l'invention peut comprendre au moins une étape de dégradation des acides nucléiques présents en quantités importantes après le cassage des cellules. A cet effet,
10 les enzymes de restriction non spécifiques de type endo- ou exonucléases peuvent être employées. Selon un mode préféré, l'enzyme choisie est la benzonase, éventuellement en présence de β cyclodextrine qui facilite la précipitation des lipides (concentrations finales recommandées de 5 à 50 U/ml de benzonase et de 0,1 à 10 % et, en particulier, 1,5 % de β
15 cyclodextrine).

Le protocole de l'invention peut également comprendre une étape facultative d'inactivation des virus à enveloppe. Cette étape permet, notamment dans le cas des préparations adénovirales d'améliorer la sécurité du produit final et d'augmenter la qualité de la préparation adénovirale
20 purifiée. Un exemple d'étape d'inactivation de virus à enveloppe est donné dans la demande de brevet français No. 98/16147. Il est possible de procéder à l'étape d'inactivation et à l'étape de dégradation des acides nucléiques de manière concomitante.

Le protocole pour la production de particules virales selon l'invention
25 peut également comprendre une étape de filtration stérilisante, ladite étape de filtration stérilisante étant de préférence réalisée après l'étape (c) ou (ii) dudit procédé de préparation. On aura avantageusement recours à des filtres de 0,22 µm. On peut citer, par exemple, les unités de filtration de type

Minisart (Sartorius, référence SM16534), Sartolab P20 (Sartorius, référence 18053D), Millex GF (Millipore, référence SLGS025BS), Millex GV (Millipore, référence SLGV025BS), Millex GP (Millipore, référence SLGPR25LS) ou encore Spirale Cap (Version Super CQS 92 HS ou HP ; Gelman Sciences),
5 Criticap 50 (12995, Gelman Sciences) ou Millipak (Millipore ref. MPGL04SK2 ou MPGL02SH2) .

Le procédé de purification d'une préparation virale brute et le protocole pour la production de particules virales selon l'invention concernent notamment des préparations virales comprenant des particules virales
10 d'intérêt pour des applications en thérapie génique, et notamment pour la préparation de préparations vaccinales, telles que par exemple des particules adénovirales, poxvirales, iridovirales, papovavirales, rotavirales, parvovirales, hepadnavirales, herpétiques, réovirales, coronavirales, flavivirales, togavirales, mononegavirales, arenavirales, bunyavirales, orthomyxovirales,
15 calcivirales, picornavirales. De préférence, ces particules virales renferment un virus recombiné. Selon la présente invention, la préparation virale brute que l'on cherche à purifier peut contenir une ou plusieurs particules virales d'origines virales différentes.

La mise en oeuvre des procédés et protocoles de l'invention est tout
20 particulièrement adaptée à l'obtention de particules adénovirales purifiées comprenant des adénovirus recombinants défectifs pour la réplication. « Recombinant » fait référence à la présence d'au moins un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments appropriés à son expression dans une cellule hôte. «Défectif pour la réplication » signifie que les informations
25 génétiques disponibles ne permettent pas la réplication autonome du virus considéré dans une cellule hôte. Dans ce cas, la production de particules virales requiert l'infection ou la transfection par tout moyen approprié, de cellules adaptées, dite cellules de complémentation, avec le virus déficient

généralement recombiné. Ces cellules de complémentation fournissent *en trans* les informations nécessaires à la réplication et l'assemblage des virus déficients sous forme de particules virales. De telles lignées, ainsi que leur utilisation, sont largement décrites dans la littérature (voir par exemple les
5 demandes WO 94/28152 ou WO 97/00326 ; la lignée 293, Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72 ; Lusky et al. ,1998, J. Virol. 72, 2022-2032). D'autres virus pour leur part requièrent des conditions de culture cellulaire plus spécifiques mais parfaitement maîtrisées (voir par exemple VV, MVA, rétrovirus,...). Les cellules de complémentation infectées ou transfectées sont
10 mises en culture dans des conditions largement décrites, pendant un temps suffisant pour permettre aux virus de se répliquer, et aux particules virales de s'assembler.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après. Toutefois, l'invention ne
15 saurait se limiter au contenu desdits exemples.

EXEMPLES

Les adénovirus recombinants utilisés dans les exemples qui suivent, ont été construits par la technique de recombinaison homologue décrite dans Chartier et al. (1996, J. Virol. 70, 4805-4810). Les constructions mises en
20 oeuvre ont été réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ou une édition plus récente) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de clonage utilisent la souche
25 E. coli 5K (hsdR, mcrA), DH5a [(recA1, endA1, hodR17 (r-m-), supE44 thi-1, gyrA (nalr)] ou NM522 (supE, thi, D(lac-proAB), Dhsd5, (r-m-), (F' proAB, lacI^q, ZDM15) et celles de recombinaison homologue la souche E. coli BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la réparation

des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'E. coli (Klenow, Boehringer Mannheim). Les fragments d'ADN sont purifiés à l'aide du kit de purification d'ADN GeneCleanII^R (Bio101Inc.).

- 5 Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées
10 ou transduites et cultivées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On a recours aux lignées cellulaires 293 (ATCC CRL-1573), A549 E1+ (WO94/28152) et 293-E4ORF6+7 (Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C en atmosphère
15 humide enrichie à 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL) complémenté avec 1 mM de glutamine, 1% d'acides aminés (Gibco BRL), 40mg/l de gentamycine et 10% de sérum de veau foétal (SVF, Gibco BRL). Les cellules sont transfectées selon les techniques de l'art (précipitation au phosphate de calcium...)

- 20 Les exemples qui suivent ont été réalisés à l'aide d'adénovirus recombinants exprimant un gène marqueur ou un gène thérapeutique. Ils sont dérivés du sérotype Ad5 et ont la structure suivante:

- AdTG6297 est un vecteur adénoviral défectif pour les fonctions E1 (délétion des nt 459 à 3328) et E3 (délétion du fragment XbaI s'étendant des
25 nt 28592 à 30470) dans le génome duquel est inséré en remplacement de la région E1, une cassette d'expression du gène marqueur codant pour la protéine GFP (pour green fluorescent protein). Celle-ci réagit à l'excitation lumineuse (485 nm) par l'émission d'une lumière fluorescente dont on mesure

- l'intensité au moyen d'un filtre (535 nm). Plus précisément, la cassette est composée du promoteur CMV suivi d'un intron chimère, de la séquence codant pour la protéine GFP et le polyA du virus SV40. Les séquences introniques sont isolées du plasmide pCI (Promega Corp, pCI mammalian expression vector E1731) et comprennent le site donneur d'épissage de l'intron 1 du gène b-globine humaine ainsi que le point de branchement et le site accepteur d'épissage du gène d'une immunoglobine de souris. Les particules virales sont produites par transfection du vecteur AdTG6297 dans une lignée de complémentation de E1 (293 ou A549 E1+) et amplifiées par passages successifs sur une lignée permissive (complémentant E1).
- Le vecteur AdTG5643 est un vecteur délété des régions E1 (nt 459 à 3328), E3 (nt 28592 à 30470) et E4 (nt 32994 à 34998) et exprimant le gène thérapeutique CFTR humain. La cassette d'expression est constituée du promoteur précoce CMV, de l'ADNc CFTR et du poly A du gène b-globine de lapin et est insérée à la place des séquences E1 délétées. Les particules virales sont produites par transfection du vecteur AdTG5643 dans une lignée de complémentation de E1 et E4 (293-E4ORF6+7) et un stock viral constitué par passages successifs sur une lignée permissive (complémentant E1 et E4).
- Le vecteur AdTG13383 est un vecteur délété des régions E1 (nt 459 à 3511), E3 (nt 28539 à 30470) et exprimant le gène thérapeutique IL2 humain. La cassette d'expression est constituée du promoteur précoce CMV, de l'intron synthétique isolé de pCI (décrit ci-dessus) de l'ADNc codant pour l'IL-2 humaine et du poly A SV40 et est insérée à la place des séquences E1 délétées. Les particules virales sont produites par transfection du vecteur pTG13383 dans une lignée de complémentation de E1. Un stock viral est constitué par passages successifs sur une lignée permissive (complémentant E1).

EXEMPLE 1 : Préparation de virus à partir des cellules de complémentation.

Les cellules A549-E1+ sont cultivées en boîtes de culture jusqu'à atteindre une concentration de 1×10^6 cellules/ml et sont ensuite infectées
5 avec un préstock d'AdTG6297 à raison d'une MOI d'environ 3. Les cellules infectées sont récoltées à 72 h post infection et centrifugées à basse vitesse. Le culot est repris dans environ 600 ml de milieu de culture sans sérum. La préparation ainsi obtenue correspond à un volume d'environ 20 l de culture.

Les particules virales intracellulaires sont libérées après cassage des
10 cellules soumises à l'action mécanique pendant 7 à 10 min d'un homogénéiseur Silverson (L4R- Silverson) réglé à une vitesse de rotation de 4200 tours/min.

A ce stade, la préparation est très visqueuse du fait de la libération de l'ADN génomique suite au cassage cellulaire. On ajoute à la préparation
15 virale un volume d'un tampon permettant une action optimale de la benzonase et constitué de Tris 100 mM, $MgCl_2$ 4 mM, saccharose 4% pH 8,5 auxquels a été ajouté l'agent de solubilisation Tween 80 (Merck référence 8-22187-1000) à une concentration de 2%. Le mélange est mis sous agitation à température ambiante avant d'ajouter la benzonase à raison de 50 U/ml
20 (Merck référence 101697) et on laisse la réaction se poursuivre pendant 1 à 2 h à température ambiante et sous agitation.

EXEMPLE 2 : Préparation de virus à partir de la culture cellulaire.

L'exemple 1 est reproduit à la différence que l'on récolte 72 h post
25 infection les cellules et le surnageant de culture (volume d'environ 20 l) et l'ensemble est directement soumis à l'étape de cassage pour obtenir la préparation virale brute à purifier.

EXEMPLE 3 : Purification de la préparation virale brute à l'aide d'une étape de chromatographie en lit fluidisé.

L'exemple 3 a pour but d'illustrer un mode de réalisation du procédé selon l'invention pour l'obtention de particules virales purifiées.

- 5 Dans un premier temps, l'une quelconque des préparations virales brutes obtenues aux exemples 1 et 2 est soumise à une étape d'inactivation des virus enveloppés. Cette étape d'inactivation est réalisée par action du TNBP/Tween 80 (Tributyl phosphate Réf. : 24 0494 Aldrich) à une concentration finale de 0,3 % et 1% respectivement. Pour ce faire, la
- 10 préparation virale brute obtenue à l'exemple 1 ou 2 est diluée volume à volume dans une solution tampon de Tris 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, saccharose 2% NaCl 450 mM et TNBP 0,6 % (Aldrich 24-049-40), pH 8,5. Il est également possible d'ajouter à la préparation virale 1/10 de volume d'un tampon plus concentré Tris 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, saccharose 2%, NaCl 2 M et TNBP 3 %
- 15 (Aldrich 24-049-40), pH 8,5. Il faut remarquer que les conditions salines utilisée (NaCl 400mM final) correspondent aux conditions d'équilibration de la chromatographie. L'action du TNBP / Tween 80 se poursuit sous agitation (500 rpm) pendant 3 heures à température ambiante ou pendant 4 heures à 4°C.
- 20 La préparation virale brute inactivée est ensuite soumise à une chromatographie d'échange d'ions en lit fluidisé. Pour ce faire, la préparation virale est chargée sur une colonne contenant une résine de type Streamline® QXL (Réf. Pharmacia 17-5075-01) préalablement équilibrée à l'aide d'un tampon Tris 50 mM, $MgCl_2$ 2mM, saccharose 2%, NaCl 400 mM, pH 8,5.
- 25 L'introduction du tampon se fait à la base de la colonne de chromatographie et sa sortie s'opère au sommet de la colonne, de manière à créer un courant de tampon ascendant dans la colonne. Un débit de 100 à 300 cm/h, et de préférence 150 cm/h est utilisé pour équilibrer et charger la colonne avec la

préparation virale brute à purifier. La préparation virale appliquée sur la colonne est alors rincée par différents passages de solution tampon dans le sens ascendant et descendant. Cette opération a pour but d'éliminer une première gamme de contaminants adsorbés par des interactions non ions-
5 spécifiques ou mécaniquement coincés. Les différents constituants cellulaires adsorbés par des interactions ions-spécifiques sur le support de chromatographie sont ensuite élués progressivement par application d'un tampon d'équilibrage contenant des concentrations de sel croissantes (NaCl 425 mM, 450 mM, 500 mM). Un débit de 50 à 150 cm/heure et de préférence
10 de 100 cm / heure est appliqué à partir du moment où le flux de tampon est descendant. L'éluat est recueilli en fractions. Chaque fraction est analysée par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm. Généralement, les protéines qui sont détectées uniquement à 280 nm, sont éluées par le tampon contenant une concentration en NaCl de 425 mM. Un second pic d'élution est
15 détecté à 280 et 260 nm. Il contient les particules adénovirales d'intérêt et est élué par le tampon de concentration saline 450 mM. Les fractions correspondant à ce second pic d'élution sont rassemblées et éventuellement soumises à une chromatographie de gel filtration.

La colonne de chromatographie en lit fluidisé peut être régénérée,
20 lavée et traitée par l'enchaînement d'étapes montré dans le tableau 1 :

Tableau 1

Solution	Concentration	Volume de colonne (Vc)	Débit (cm/h)	Sens
NaCl	1,5 M	4	100	Descendant
HCl	0,05 N	9	30	Ascendant
H2O		6	100	Ascendant
NaOH	1 N	12	30	Ascendant
NaCl	3 M	9	30	Ascendant
Tris-HCl EDTA PH 8,0	10 mM 1 mM	9	30	Ascendant

Le gel peut être ensuite stocké dans NaOH 0,01 M pendant plusieurs semaines.

Le rendement d'un procédé d'obtention des particules virales peut
5 être calculé de la manière suivante :

Etapes	UI totales x 10 ¹³	Rendement - % (global)	Rendement -% (étape)
Départ	2,69	100	-
Benzonase	2,74	102	102
Inactivation	2,58	96	94
SQXL	2,11	78	82

UI représente le nombre d'unités infectieuses

Le procédé de l'invention permet de purifier un volume de l'ordre de 20 litres de préparation virale brute tout en obtenant un rendement global
10 d'environ 80% après l'étape de chromatographie en lit fluidisé alors que les procédés de l'art antérieur permettent au mieux d'obtenir des rendements de l'ordre de 60 % après l'étape de chromatographie en lit paqué.

EXEMPLE 4 : Préparation d'un lot clinique de particules adénovirales infectieuses à visée anti-cancéreuse (transfert du gène IL-2).
15

Les cellules de complémentation E1 sont cultivées en bioréacteur en milieu Excell 525 (JRH Biosciences) jusqu'à l'obtention d'une concentration de 1x10⁶ cellules/ml et sont ensuite infectées avec une aliquote d'un préstock
20 d'AdTG13383 à une MOI d'environ 10. Les cellules infectées et le surnageant de culture (volume d'environ 20 l) sont récoltés à 72 h post infection. Les particules virales intracellulaires sont libérées après cassage des cellules soumises à l'action mécanique pendant 7 à 10 min d'un homogénéiseur Silverson (275 UHLS) réglé à une vitesse de rotation de 50 Hz (vitesse de

8.1).

La préparation virale brute ainsi obtenue est soumise une étape de clarification afin d'éliminer les insolubles (débris cellulaire, floculats de macromolécules ...etc). On procède à des filtrations successives sur des
5 filtres de porosité décroissante, tout d'abord sur un filtre de porosité 8 μm (Sartopure 300PP2 5592501) puis sur un filtre de porosité 5 μm (Sartopure 300 PP3 5592542) et enfin sur un filtre de porosité comprise entre 3 et 0,8 μm (Sartorius, Sartoclean CA capsule 5621304E9-00-A).

La préparation virale clarifiée est soumise à une étape de dégradation
10 de l'ADN (action de la benzonase) et, de manière concomitante, à une étape d'inactivation des virus enveloppés (action du mélange TNBP 0,3% /Tween 80 1%). Pour ce faire, on ajoute à la préparation virale clarifiée un volume d'un tampon Tris 100 mM, MgCl_2 4 mM, saccharose 4%, pH 8,5 comprenant du Tween 80 (Merck référence 8-22187-1000) à une concentration de 2%. Le
15 mélange est mis sous agitation à température ambiante avant d'ajouter la benzonase à raison de 10 U/ml (Merck référence 101697) et le TNBP (Aldrich 24-049-40) à une concentration finale de 0,3%. On laisse la réaction se poursuivre pendant 2 h à température ambiante et sous agitation (500 tr/min).

La préparation virale ainsi obtenue est diluée dans un volume de Tris
20 50 mM, MgCl_2 2 mM, saccharose 2%, NaCl 2M de manière à obtenir une conductivité de 35 mS/cm optimale à la mise en oeuvre de la chromatographie d'échange d'ions en lit fluidisé.

La préparation virale ajustée en conductivité est chargée sur une colonne contenant une résine de type Streamline® Q XL (Réf. Pharmacia 17-
25 5075-01) préalablement équilibrée à l'aide d'un tampon Tris 50 mM, MgCl_2 2mM, saccharose 2%, NaCl 360 mM, pH 8,5. L'introduction du tampon se fait à la base de la colonne de chromatographie et sa sortie s'opère au sommet de la colonne, de manière à créer un courant de tampon ascendant dans la

colonne. Un débit de 300 cm/h est appliqué lors des de l'équilibrage et de la charge de la colonne avec la préparation virale. Une fois la charge effectuée, la colonne est alors rincée par différents passages de solution tampon dans le sens ascendant et descendant dans le but d'éliminer les contaminants
5 adsorbés par des interactions non ions-spécifiques ou mécaniquement bloqués. Les différents constituants cellulaires adsorbés par des interactions ions-spécifiques sur le support de chromatographie sont ensuite élués progressivement par application d'un tampon d'équilibrage contenant des concentrations de sel croissantes (NaCl 650 mM, 2 M). Un débit de 150 cm
10 / heure est appliqué à partir du moment où le flux de tampon est descendant. Les fractions éluées sont analysées par mesure de l'adsorbance à 260 et 280 nm. Les particules virales adsorbent aux deux longueurs d'onde avec un ratio DO 260 / DO 280 d'environ 1,25 (1,22 à 1,28) et généralement, le pic d'élution se situe à une zone de concentration saline de 650 mM.

15 La colonne de chromatographie en lit fluidisé peut être régénérée et lavée selon le protocole indiqué précédemment.

Les fractions obtenues après la chromatographie en lit fluidisé et contenant les particules adénovirales sont concentrées par diafiltration sur Labscale (Millipore) en utilisant les cassettes BioMax PES (Millipore référence
20 PXB01MC50) ou des membranes de cellulose ayant un seuil de coupure de 300kDa et 1000 kDa.

La préparation virale concentrée est ensuite soumise à une chromatographie de gel filtration. Pour ce faire, la préparation virale est chargée sur une colonne contenant une résine de type Toyopearl HW65F
25 (Réf. Tosohaas 07465) préalablement équilibrée à l'aide d'un tampon Tween 80 54 mg/l, Saccharose 2%, Tris 10 mM, Aspartate de Na 10 mM, pH 8,5. L'introduction du tampon se fait par le haut de la colonne de chromatographie et sa sortie s'opère par le bas. Un débit de 30 cm/h est utilisé pour équilibrer

et charger la colonne avec la préparation virale concentrée. La préparation virale appliquée sur la colonne (environ 20% du volume de colonne) est alors rincée par le tampon qui a permis d'équilibrer la colonne (Tween80 54 mg/l, Saccharose 2%, Tris 10 mM, Asp Na 10 mM, pH 8,5) dans le sens descendant. Cette opération a pour but d'éliminer les contaminants de petits poids moléculaire ralentis par le passage dans les pores du gel, contrairement au virus qui est exclu des billes de gel. Les différents constituants cellulaires ralentis sur le support de chromatographie sont ensuite élués progressivement toujours par même tampon. L'éluat est recueilli en fractions. Chaque fraction est analysée par mesure de l'adsorbance à 260 et 280 nm. Généralement, le premier pic détecté à 280 et 260 nm, contient les particules adénovirales d'intérêt alors que les contaminants protéiques détectés uniquement à 280 nm, sont élués en deuxième position. Les fractions correspondant au premier pic sont rassemblées, éventuellement concentrées par diafiltration, placées dans un tampon de formulation approprié (par exemple en solution saline ou isotonique) puis filtrées sur 0.22µm Sartolab P20 (Sartorius, référence 18053D) et conservées jusqu'à utilisation.

Le rendement d'un procédé d'obtention des particules virales peut être calculé de la manière suivante :

Étapes	Rendement UI - % (global)	Rendement UI - % (étape)	Rendement PT - % (global)	Rendement PT -% (étape)
Départ	100	-	100	-
Clarification	96	96	78	78
Dnase / Inactivation	130	135	112	144
SQXL	107	82	88	78
Concentration / Diafiltration	107	100	86	98
Gel filtration	86	80	77	90

UI représente le nombre d'unités infectieuses déterminé par une

mesure quantitative de l'immunofluorescence avec un anticorps anti-DBP tel que décrit dans Lusky et al. (1998, J. Virol 72, 2022-2032)
PT représente le nombre de particules virales totales déterminé par la mesure de l'adsorbance à 260 et 280 nm.

5

Le procédé de l'invention permet de purifier un volume de l'ordre de 20 litres de préparation virale brute tout en obtenant un rendement global d'environ 90% après l'étape de chromatographie en lit fluidisé alors que les procédés de l'art antérieur permettent au mieux d'obtenir des rendements de
10 l'ordre de 60 % après l'étape de chromatographie en lit paqué. Et un rendement global de 77 à 86% après l'étape de gel filtration.

REVENDICATIONS

1. Procédé de purification d'une préparation virale brute renfermant des particules virales d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit lit fluidisé renferme des particules d'adsorbant et est obtenu par la mise en suspension dans un fluide desdites particules sous l'action d'une ou plusieurs forces sélectionnées parmi les forces mécanique, électromagnétique, magnétique, gravitationnelle et électrique.
- 10 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées de polymère et, plus particulièrement, d'un polymère choisi parmi l'agarose, le polyacrylamide, le polystyrène ou leurs dérivés.
- 15 4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant portent au moins un ligand capable de se lier de manière spécifique et réversible à un anti-ligand, ledit anti-ligand consistant en tout ou partie d'une dite particule virale d'intérêt
- 20 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit ligand consiste en un groupement chargé positivement, avantageusement un groupement basique et, plus particulièrement, un groupement sélectionné parmi les groupements diméthylaminoéthyl (DMAE), diéthylaminoéthyl (DEAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), $-R-CH(OH)-CH_2-N^+-(CH_3)_3$ (groupement Q), guanidinium ou imine tels que la polyéthylèneimine (PEI).
- 25 6. Procédé selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées d'une matrice d'agarose et comprennent un noyau central de quartz et des chaînes de dextrane couplées de manière covalente à ladite matrice d'agarose sur lesquelles est lié ledit groupement chargé positivement et, en particulier, le

groupement Q.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est réalisé dans des conditions de conductivité comprises entre environ 25 et environ 70 mS/cm, avantageusement entre environ 30 et environ 40 mS/cm et, de préférence, entre environ 30 et environ 35 mS/cm.
8. Protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant les étapes (i) et (ii) suivantes :
 - (i) obtention d'une préparation virale brute comprenant les étapes :
 - (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné;
 - (b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la replication virale et la production de particules virales ;
 - (c) collecte des cellules et/ou du surnageant,
 - (ii) purification de ladite préparation virale brute selon l'un des procédés des revendications 1 à 7.
9. Protocole selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :
 - (i) une étape de cassage ou de lyse des cellules après l'étape (c) suivie, de manière optionnelle, d'une étape de dégradation des acides nucléiques,
 - (ii) une étape d'inactivation des virus à enveloppe, et/ou
 - (iii) une étape de chromatographie en lit paqué et, en particulier, une étape de chromatographie en gel filtration..
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7 ou protocole selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que lesdites particules virales sont des particules adénovirales.

REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau International le 25 Juillet 2000 (25.07.00);
revendication 3 ajoutée; autre revendications inchangées (3 pages)]

1. Procédé de purification d'une préparation virale brute renfermant des particules virales d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit lit fluidisé renferme des particules d'adsorbant et est obtenu par la mise en suspension dans un fluide desdites particules sous l'action d'une ou plusieurs forces sélectionnées parmi les forces mécanique, électromagnétique, magnétique, gravitationnelle et électrique.
- 10 3. Procédé selon la revendication 2, comprenant :
 - a) une phase d'expansion desdites particules d'adsorbant dans une colonne de chromatographie, notamment par application d'un courant de tampon ascendant, ladite phase d'expansion étant maintenue jusqu'à l'obtention d'un lit fluidisé,
 - 15 b) une phase de dépôt de ladite préparation virale brute, notamment dans la partie inférieure de ladite colonne,
 - c) une phase de lavage par passage d'un tampon, notamment selon un courant ascendant,
 - d) une phase de sédimentation, éventuellement assistée par un flux de
20 tampon descendant,
 - e) une étape d'élution par application d'un flux de tampon, notamment descendant, afin de permettre le relargage des particules virales adsorbées sur lesdites particules d'adsorbant.
- 25 4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées de polymère et, plus particulièrement, d'un polymère choisi parmi l'agarose, le polyacrylamide, le polystyrène ou leurs dérivés.
5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce

que lesdites particules d'adsorbant portent au moins un ligand capable de se lier de manière spécifique et réversible à un anti-ligand, ledit anti-ligand consistant en tout ou partie d'une dite particule virale d'intérêt

- 5 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit ligand consiste en un groupement chargé positivement, avantageusement un groupement basique et, plus particulièrement, un groupement sélectionné parmi les groupements diméthylaminoéthyl (DMAE), diéthylaminoéthyl (DEAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), $-R-CH(OH)-CH_2-N^+-(CH_3)_3$ (groupement Q), guanidinium ou imine tels que la polyéthylèneimine (PEI).
- 10 7. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées d'une matrice d'agarose et comprennent un noyau central de quartz et des chaînes de dextrane couplées de manière covalente à ladite matrice d'agarose sur lesquelles est lié ledit groupement chargé positivement et, en particulier, le
- 15 groupement Q.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est réalisé dans des conditions de conductivité comprises entre environ 25 et environ 70 mS/cm, avantageusement entre environ 30 et environ 40 mS/cm et, de préférence, entre environ 30 et environ 35
- 20 mS/cm.
9. Protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant les étapes (i) et (ii) suivantes :
- (i) obtention d'une préparation virale brute comprenant les étapes :
- (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par
- 25 au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné;
- (b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la replication virale et la production de particules virales ;

(c) collecte des cellules et/ou du surnageant,

(ii) purification de ladite préparation virale brute selon l'un des procédés des revendications 1 à 8.

10. Protocole selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend en

5 outre :

(i) une étape de cassage ou de lyse des cellules après l'étape (c) suivie, de manière optionnelle, d'une étape de dégradation des acides nucléiques,

(ii) une étape d'inactivation des virus à enveloppe, et/ou

10 (iii) une étape de chromatographie en lit paqué et, en particulier, une étape de chromatographie en gel filtration..

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 ou protocole selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que lesdites particules virales sont des particules adénovirales.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No

PCT/FR 00/00430

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N7/02 B01D15/08 B01J8/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N B01D B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 27677 A (CANJI INC) 12 September 1996 (1996-09-12) the whole document	1-10
X	WO 97 08298 A (GENZYME CORP ; RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6 March 1997 (1997-03-06) the whole document	1-10
X	WO 97 06243 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ; FANGET BERNARD (FR); FRANCON ALAIN (F) 20 February 1997 (1997-02-20) the whole document	1-10
X	US 5 522 993 A (GUSTAFSSON JAN-GUNNAR ET AL) 4 June 1996 (1996-06-04) cited in the application the whole document	1-10
	--- -/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2000

Date of mailing of the international search report

25/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/FR 00/00430

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 41 28 953 A (BASF AG) 4 March 1993 (1993-03-04)	1-10
A	HARUNA I ET AL: "SEPARATION OF ADENOVIRUS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE" VIROLOGY, vol. 13, 1 January 1961 (1961-01-01), pages 264-267, XP000601693 ISSN: 0042-6822	1-10
A	EP 0 328 256 A (OWENS CORNING FIBERGLASS CORP) 16 August 1989 (1989-08-16) abstract * exemples *	1-10
A	WO 89 08500 A (ROBINSON ERIC) 21 September 1989 (1989-09-21) the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00430

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9627677	A	12-09-1996	US 5837520 A AU 5421396 A CA 2214837 A EP 0813606 A	17-11-1998 23-09-1996 12-09-1996 29-12-1997
WO 9708298	A	06-03-1997	AU 7010896 A CA 2230655 A EP 0847442 A JP 11511326 T	19-03-1997 06-03-1997 17-06-1998 05-10-1999
WO 9706243	A	20-02-1997	FR 2737730 A AU 712490 B AU 6496496 A BR 9609837 A CA 2226312 A CN 1199419 A EP 0848752 A NZ 313213 A US 6008036 A	14-02-1997 11-11-1999 05-03-1997 09-03-1999 20-02-1997 18-11-1998 24-06-1998 29-03-1999 28-12-1999
US 5522993	A	04-06-1996	EP 0538467 A EP 0922489 A JP 2807691 B JP 6500050 T WO 9218237 A	28-04-1993 16-06-1999 08-10-1998 06-01-1994 29-10-1992
DE 4128953	A	04-03-1993	WO 9305144 A MX 9204984 A	18-03-1993 01-04-1993
EP 0328256	A	16-08-1989	JP 2006750 A	10-01-1990
WO 8908500	A	21-09-1989	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No
PCT/FR 00/00430

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N7/02 B01D15/08 B01J8/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N B01D B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 27677 A (CANJI INC) 12 septembre 1996 (1996-09-12) le document en entier	1-10
X	WO 97 08298 A (GENZYME CORP ; RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6 mars 1997 (1997-03-06) le document en entier	1-10
X	WO 97 06243 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ; FANGET BERNARD (FR); FRANCON ALAIN (F) 20 février 1997 (1997-02-20) le document en entier	1-10
X	US 5 522 993 A (GUSTAFSSON JAN-GUNNAR ET AL) 4 juin 1996 (1996-06-04) cité dans la demande le document en entier	1-10
	--- -/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No
PCT/FR 00/00430

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DE 41 28 953 A (BASF AG) 4 mars 1993 (1993-03-04)	1-10
A	HARUNA I ET AL: "SEPARATION OF ADENOVIRUS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE" VIROLOGY, vol. 13, 1 janvier 1961 (1961-01-01), pages 264-267, XP000601693 ISSN: 0042-6822	1-10
A	EP 0 328 256 A (OWENS CORNING FIBERGLASS CORP) 16 août 1989 (1989-08-16) abrégé * exemples *	1-10
A	WO 89 08500 A (ROBINSON ERIC) 21 septembre 1989 (1989-09-21) le document en entier	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dernière Internationale No
PCT/FR 00/00430

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9627677 A	12-09-1996	US 5837520 A AU 5421396 A CA 2214837 A EP 0813606 A	17-11-1998 23-09-1996 12-09-1996 29-12-1997
WO 9708298 A	06-03-1997	AU 7010896 A CA 2230655 A EP 0847442 A JP 11511326 T	19-03-1997 06-03-1997 17-06-1998 05-10-1999
WO 9706243 A	20-02-1997	FR 2737730 A AU 712490 B AU 6496496 A BR 9609837 A CA 2226312 A CN 1199419 A EP 0848752 A NZ 313213 A US 6008036 A	14-02-1997 11-11-1999 05-03-1997 09-03-1999 20-02-1997 18-11-1998 24-06-1998 29-03-1999 28-12-1999
US 5522993 A	04-06-1996	EP 0538467 A EP 0922489 A JP 2807691 B JP 6500050 T WO 9218237 A	28-04-1993 16-06-1999 08-10-1998 06-01-1994 29-10-1992
DE 4128953 A	04-03-1993	WO 9305144 A MX 9204984 A	18-03-1993 01-04-1993
EP 0328256 A	16-08-1989	JP 2006750 A	10-01-1990
WO 8908500 A	21-09-1989	AUCUN	

